

⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Off enlegungsschrift**
⑩ **DE 42 13 444 A 1**

⑤① Int. Cl.⁵:
A 01 H 5/00
A 01 H 1/06
C 12 N 5/10
C 12 N 15/29
C 12 N 15/56
C 12 N 15/82

⑳ Aktenzeichen: P 42 13 444.7
㉔ Anmeldetag: 18. 4. 92
㉕ Offenlegungstag: 28. 10. 93

DE 42 13 444 A 1

㉑ Anmelder:

Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH,
1000 Berlin, DE

㉒ Erfinder:

Schaewen, Antje von, 4500 Osnabrück, DE;
Sonnewald, Uwe, 1000 Berlin, DE; Willmitzer,
Lothar, Prof. Dr., 1000 Berlin, DE

⑤④ Verfahren zur Herstellung von Kartoffelpflanzen, deren Knollensprossung unterdrückt ist

⑤⑦ Es wird ein Verfahren zur Herstellung genetisch veränderter Kartoffelpflanzen, deren Auskeimung der Knollensprosse unterbunden ist, sowie die neue Verwendung des bekannten Plasmids P 35S-CW-INV (DSM 5788) zur Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen, deren Knollen verbesserte Lagerungseigenschaften besitzen sowie Kartoffelknollen, deren Auskeimung der Sprosse verhindert ist, beschrieben.

DE 42 13 444 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 09 93 308 042/255

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung gentechnisch veränderter Kartoffelpflanzen, deren Auskeimung der Knollensprosse unterbunden ist, sowie die neue Verwendung eines bekannten Plasmids zur Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen mit den gleichen Eigenschaften.

Aus der EP 442 592 ist ein Plasmid p 35S-CW-INV (DSN 5788) bekannt, das eine DNA-Sequenz enthält, deren von dieser Sequenz kodiertes Produkt die Verteilung und/oder Bildung vom Photoassimilaten in Pflanzen verändert und damit zu Veränderungen im Habitus und/oder Ertrag von Pflanzen führt.

Das Plasmid p35S-CW-INV besteht aus einem Fragment A, das den 35S-Promotor des cauliflower-Mosaik-Virus enthält (Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV, nach Franck-et al. (1980) Cell 21: 285—294; kloniert als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al. (1986) Nucl Acids Res 14: 5857—5868) in das Plasmid puC18). Dem Fragment A folgt ein Fragment B, das 23 Nukleotide eines Proteinase-Inhibitor II Gens aus Solanum tuberosum enthält (Nukleotide 923—945, nach Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14: 5641—5650). Durch einen linker von 7 Basenpaaren mit der Sequenz AGCTTTC wurde diese Sequenz an das suc2 Gen aus Hefe, umfassend die Nukleotide +64 bis +1765 (Tausig & Carlson (1983) Nucl Acids Res 11: 1943—1954), fusioniert. Der kodierenden Region von suc2 folgt ein Fragment C, das das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J 3: 835—846) enthält. Die Fragmente A, B und C wurden als Ganzes in einen binären Vektor kloniert und zur Transformation von Solanum tuberosum mit Hilfe des Agrobacterium-Systems eingesetzt.

In der EP 442 592 wird u. a. die Verwendung des Invertasgens suc2 zur Modifikation der Bildung und/oder Verteilung von Photoassimilaten beschrieben. Über die Expression eines Invertasgens zur Unterbindung des Transports von Speicherstoffen ist nichts bekannt.

Ferner ist über die Eigenschaft des Plasmids, Kartoffelknollen dahingehend zu verändern, daß ihre Lagerung verbessert wird bisher nichts bekannt.

Das Plasmid p 35S-CW-INV (DSM 5788) wurde am 12. Februar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig Bundesrepublik Deutschland hinterlegt.

Die Speicherorgane der Kartoffel enthalten als Speicherstoff im wesentlichen Stärke. Die Metabolisierung der Stärke liefert die energiereichen Verbindungen, die beim Auskeimen der Knollen nötig sind. Im Falle von Saatkartoffeln ist das jahreszeitlich frühe Auskeimen der Knollen von Interesse; bei Kartoffelknollen, die zu Speisezwecken verwendet werden, ist die Bildung von Sprossen jedoch nachteilig. Einerseits werden bei der Auskeimung wertvolle Speicherstoffe wie Stärke abgebaut, andererseits verändert sich auch die Konsistenz der Knolle, die an Festigkeit verliert und im Geschmack nachläßt. Um das Auskeimen während der Lagerung oder des Transports von Kartoffelknollen zu verhindern, müssen diese trocken und kühl gehalten werden, da Temperaturen über 8°C und Feuchtigkeit als Indikatoren des Beginns der Vegetationsphase Signale für die Sproßbildung sind. Diese Art der Lagerung ist einerseits kostenintensiv, da sie spezielle, klimatisierte Räume erfordert. Andererseits hat sie auch negative Konsequenzen für die stoffliche Zusammensetzung der Knollen:

niedrige Temperaturen führen bei Kartoffelknollen zu einer Umwandlung von Stärke in wasserlösliche Zucker. Dieser als cold sweetening bezeichnete Effekt wird als eine Adaption an Standorte mit Temperaturen unter dem Gefrierpunkt diskutiert, da wäßrige Lösungen mit steigender Konzentration an gelösten Stoffen eine zunehmende Gefrierpunktniedrigung erfahren. Der Abbau von Stärke zu reduzierenden Zuckern führt zu einer Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe und senkt insofern die Temperatur, bei der es zu einer Bildung von Eiskristallen in der Zelle kommt. Die Qualität der Kartoffelknollen als Nahrungsmittel wird durch das cold sweetening jedoch erheblich herabgesetzt, da die gesteigerte Konzentration an reduzierenden Zuckern die Konsistenz der Knollen veränderte beispielsweise kommt es beim Fritieren zu einer unerwünschten Braunfärbung des Gewebes in Folge einer Maillard-Reaktion. Darüberhinaus führt das cold sweetening zu einer Mobilisation von Reservestoffen mit der Folge, daß das Auskeimen der Sprosse metabolisch vorbereitet wird, indem energiereiche Verbindungen wie Zucker für die heterotrophe Wachstumsphase des Austreibens bereitgestellt werden. Bei einem Anstieg der Temperatur setzt die Keimung dann beschleunigt ein. Es sind daher zahlreiche Versuche unternommen worden, das cold sweetening als Begleiterscheinung der Kühlagerung zu unterbinden. Ein Ansatz hierzu kann die Inhibition vakuolärer Invertasen sein, die auf gentechnischem Weg durch Expression einer "anti-sense" RNA zur Invertase oder durch Expression eines Invertase-Inhibitors möglich ist. Infolge der Inhibition kann Saccharose in der Vakuole nicht mehr in Glukose und Fruktose gespalten werden. Da keine cytosolischen Invertasen nachgewiesen sind, muß angenommen werden, daß unter diesen Umständen eine Spaltung von Saccharose in reduzierende Zucker nicht mehr erfolgt, so daß Saccharose akkumuliert. Eine Alternative ist die beschleunigte Verstoffwechselung der anfallenden Zucker. Diese Strategie wird in EP 438 904 beschrieben. Durch Steigerung der Aktivität von Phospho-Fruktokinase (PFK; EC 2.7.1.11), einem Schlüsselenzym der Glykolyse, werden die zellulären Konzentrationen von Saccharose und reduzierenden Zuckern erniedrigt. Derartige Strategien erlauben zwar eine Reduktion der Zuckerkonzentration auch bei kühler Lagerung, allerdings um den Preis eines hohen Verlusts an Reservestoffen. Darüberhinaus ist ein Unterbinden des cold sweetening im Hinblick auf das Lagerungsproblem eine unbefriedigende Lösung, da der Kostenfaktor der Kühlagerung bestehen bleibt.

Um die zum Auskeimen nötigen Kohlehydrate wie Saccarose aus gespeicherter Stärke bzw. den Stärketransport an den Ort des heterologen Sproßwachstums zu verhindern, muß der Kohlenhydratmetabolismus von Kartoffelknollen modifiziert werden.

Die Stoffwechselwege zum Abbau der Stärke und zum Zwecke der Respiration sind bekannt. In Fig. 1 ist der Abbauweg der Stärke und die Bildung der Transportform Saccharose mit den daran beteiligten Enzymen gezeigt.

In Fig. 1 bedeuten:

- a = Stärkphosphorylase,
- b = Beta-Amylase,
- c = Alpha-Amylase,
- d = Glukoseidase,
- e = Phosphoglukomutase,
- f = Hexaokinase,
- g = Glukose-6-Phosphat-Isomerase,
- h = UDP-Glukose-Pyrophosphorylase.

i = Saccharose-Phosphat-Synthase,

j = Saccharose-Phosphatase k = Invertase.

Die Saccharose wird an die Orte des Auskeimens der Sprosse transportiert und dort metabolisiert.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß eine Unterbrechung des Abbaupfades der Stärke in Knollen von Kartoffeln zu einer Verhinderung des Auskeimens von Knollen bei der Lagerung führt.

Die Herstellung genetisch veränderter Kartoffelpflanzen deren Auskeimung der Knollensprosse unterbunden ist, erfolgt dadurch, daß die Konzentration der für die Auskeimung der Sprosse notwendige Saccharose reduziert wird durch Inhibition der an Stärkeabbau beteiligten Enzyme und/oder durch Abbau der bereits gebildeten Saccharose mittels Einführung und Expression eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls in Pflanzen, das sich zusammensetzt aus:

- i) einen in Pflanzen funktionalen Promotor
- ii) mindestens einer kodierenden DNA-Sequenz in sense und/oder antisense Orientierung, die an eine Signalsequenz gekoppelt sein kann, und die derart an den Promotor i) fusioniert ist, daß der kodierende oder nicht-kodierende Strang abgelesen werden kann und
- iii) einen in Pflanzen funktionalen Signal für Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls und das auf einem Plasmid lokalisiert in das Genom der Kartoffelpflanzen integriert wird.

Eine Unterbrechung ist sowohl in einem späten Abschnitt des Abbaupfades der Stärke, als auch bei einem früheren möglich. So kann der Abbau der Stärke durch Inhibition der Enzyme Amylase, Stärke-Phosphorylase, Maltase, Maltosephosphorylase, UDP-Glukose-Pyrophosphorylase, Saccharose-Phosphat-Synthase oder Saccharose-Phosphat-Phosphatase unterbrochen werden. Hierzu wird eine diese Enzyme kodierende Sequenz in antisense Orientierung über das oben beschriebene Verfahren in die Pflanze eingeführt.

Die bereits gebildete Saccharose kann durch das Enzym Invertase in die nicht transportfähigen Zucker Glukose und Fruktose umgewandelt werden. Hierzu wird eine dieses Enzym kodierende Sequenz in sense Orientierung über das oben beschriebene Verfahren in die Pflanze eingeführt.

Sollen sowohl die Enzyme Amylase, Stärke-Phosphorylase, Maltase, Maltosephosphorylase, UDP-Glukose-Pyrophosphorylase, Saccharose-Phosphat-Synthase oder Saccharose-Phosphat-Phosphatase inhibiert und die bereits gebildete Saccharose mittels des Enzyms Invertase in Fruktose und Glukose umgewandelt werden, so ist eine Kombination der kodierenden DNA-Sequenzen dieser Enzyme in anti-sense bzw. sense Orientierung auf einen Plasmid gemäß dem oben genannten Verfahren möglich.

Die Unterbrechung des Flusses von Speicherstoffen zu den Orten des Sproßwachstums mittels einer zellwandständige Invertase stellt einen Eingriff beim letzten Glied des Stärkeabbaupfades dar.

Es wurde weiterhin gefunden, daß nach Einführung der auf dem Plasmid p 35S-CW-INV (DSM 5788) lokalisierten DNA in das Genom einer Kartoffelpflanze der Abbaupfad der Stärke beim letzten Glied wirksam unterbrochen werden kann, wobei die Mobilisation von Speicherstoffen in den Speichergeweben unterdrückt wird, wobei gleichzeitig das Auskeimen der Kartoffel-

knollen unterbunden wird, was zu einer verbesserten Lagerung der Knollen führt. Diese Knollen können bei Raumtemperatur für lange Zeit gelagert werden.

Bei Lagertemperaturen über 8°C wird eine Anreicherung von reduzierenden Zuckern ("cold sweetening") verhindert. Dies bedeutet eine erhebliche Qualitätssteigerung der Kartoffelknollen. Eine Kühlhauslagerung von Speisekartoffeln zur Verhinderung des Auskeimens wird damit überflüssig.

Unter reduzierenden Zuckern sind z. B. Fruktose und Glukose zu verstehen. Unter Speicherstoffen sind insbesondere Stärke zu verstehen.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion oder die Elektroporation von DNA sowie weitere Möglichkeiten. Werden für die Transformation *Agrobacterien* verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige Vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in *Agrobakterien* replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobakterien* replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die *Agrobakterien* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163: 181-187). Das als Wirtszelle dienende *Agrobacterium* soll ein Plasmid, das eine Vir-Region trägt, enthalten. Die Vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann enthalten sein. Das so transformierte Bakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen benutzt.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z. B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Zellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA getestet werden. Bei der Injektion und Elektroporation sind an sich keine speziellen Anforderungen an die Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig. Jeder Eingriff, der eine Bereitstellung von energiereichen Verbindungen, insbesondere für die Auskeimung von Vegetationspunkten der Knolle, verhindert, ist eine Anwendung der vorliegenden Erfindung. Am Beispiel der Expression einer zellwandständigen Invertase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird die Durchführung beschrieben. Invertase ist ein Enzym, das die Spaltung von Saccharose-

molekülen in Glukose und Fruktose katalysiert. Derartige Enzyme kommen in Pflanzenzellen vor und unterliegen dort einer strengen Kontrolle ihrer Aktivität einerseits durch die Substratkonzentration andererseits durch Kompartimentierung innerhalb der Zelle. Die Einführung des Hefe-Invertasegens *suc2* in Pflanzenzellen durchbricht diesen Kontrollmechanismus und hat weitreichende Konsequenzen für den Habitus der Pflanze (vgl. v. Schaewen et al. (1990) *EMBO J* 9: 3033—3044 sowie EP 442 592).

Es wurde nun gefunden, daß die apoplastischen Invertaseaktivität in den Zellen der Kartoffelknolle für die Kapazität zum Auskeimen erstaunlich groß ist. Nach 8—10 Wochen nach dem Auskeimen von Kontrollpflanzen findet bei Raumtemperatur kaum Sproßbildung statt (s. Ausführungsbeispiel 2). Durch Kombination der kodierenden Sequenz der Hefe-Invertase mit geeigneten Regulatorsequenzen kann eine Modifikation der im Ausführungsbeispiel 1 beschriebenen Durchführung vorgenommen werden. Wünschenswert ist die Expression der apoplastischen Invertase während der Ruhephase der Kartoffelknolle, die dem Auskeimen voran geht. Wird eine Invertase nur zu diesem Zeitpunkt aktiv, tritt kein Effekt für die Einlagerung von Reservestoffen während der Vegetationsphase der Pflanze auf. Durch Kombination mit exogen regulierbaren Steuerelementen, beispielsweise wundinduzierbaren oder temperaturregulierten Promotoren, kann auch das Problem der vegetativen Vermehrung von Kartoffelpflanzen, deren Knollen bei Aktivität der Invertase nicht auskeimen, gelöst werden. Zu denken wäre hier beispielsweise auch an eine Steuerung der Expression eines die Expression der Invertase unterbindenden Invertase-anti-sense-Konstrukts mit Hilfe exogener Signalstoffe, sogenannter Induktoren (vgl. Gatz et al. (1992) *Plant J.* im Druck sowie DE-OS 41 00 594). Ferner ist die spezifische Expression eines die Hefe-Invertase auf Protein-(Enzym-)ebene inaktivierenden, proteinogenen Inhibitors möglich.

Die Kartoffelknollen, deren Lagerungseigenschaften durch das Unterbinden des Auskeimens der Sprosse verbessert sind, können wieder ausgesät werden und zu ganzen Kartoffelpflanzen angezogen werden. Die Knollen dieser Pflanzen weisen die identischen Merkmale der ausgesäten Kartoffel auf.

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele wird vorab eine Aufstellung aller für diese Versuche notwendigen und an sich bekannten Verfahren gegeben:

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC 18/19, pUC 118 und N13mp10 Serien (Yanisch-Perron et al. (1985) *Gene* 33: 103—119) sowie pMPK110 (Eckes (1984), Dissertation Universität zu Köln) verwendet. Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor BIN 19 (Bevan (1984) *Nucl. Acids Res* 12: 8711—8720) kloniert.

2. Bakterienstämme

Für die pUC- und M13mp-Vektoren wurden die *E. coli*-Stämme BMH71-18 (Messing et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci* 24: 6342—6346) oder TB1 benutzt.

Für den Vektor BIN 19 wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm TB1 benutzt. TB1 ist ein rekombinationsnegatives, Tetracyclinresistentes Derivat des Stammes

JM101 (Yanisch-Perron et al. (1985) *Gene* 33: 103—119). Der Genotyp des TB1-Stammes ist (Bart Barrel, persönliche Mitteilung): *F'*(*traD36, proAB, LacI, LacZΔM15, Δ(lac, pro), SupE, thiS, recA, Sr1::Tn10(TcR)*).

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanze wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes LBA4404 (Bevan (1984) *Nucl. Acids Res* 12: 8711—8720) durchgeführt.

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Bei BIN 19 Derivaten erfolgt der Transfer der DNA in die *Agrobacterien* durch direkte Transformation nach der Methode von Holsters et al. (1978) (*Mol Gen Genet* 163: 181—187). Die Plasmid-DNA transformierter *Agrobakterien* wurde nach der Methode von Birnboim & Doly (1979) (*Nucl. Acids Res* 7: 1513—1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Pflanzentransformation

Zehn kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur wurden in 10 ml MS-Medium mit 2% Saccharose gelegt, welches 30—50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3—5 minütigem, leichtem Schütteln wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 2 mg/l Zeatinriboside, 0,02 mg/l Naphthylethylsäure, 0,02 mg/l Gibberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8% Bacto Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium um die Hälfte reduziert.

5. Invertaseaktivitätstest

Blattsegmente wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einen Puffer aus 50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 2 mM Benzamidin; 2 mM Epsilon-Aminocapronsäure; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,5 mM PMSF; 0,1% Triton X-100; 10% Glycerin extrahiert. Ein Aliquot dieses Extrakts entsprechend 10 bis 30 µg Chlorophyll wurden mit 0,6 M Saccharose und 0,125 M Natriumacetat (pH 5,0) versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 75 µl 0,15 M Ba(OH)₂ und 50 µl 0,3 M ZnSO₄ gestoppt und die freigesetzte Glukose nach Riens et al. (1991) *Plant Physiol* 97: 227—133 bestimmt.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele beschreiben die bekannte Herstellung des Plasmids p 35S-CW-INV (DSM 5788), die Transformation von Kartoffelpflanzen mit Hilfe dieses Plasmids, die Analyse der Invertaseaktivität in transgenen Pflanzen und die Lagerkapazität der Kartoffelknollen.

Ausführungsbeispiel 1

Herstellung des Plasmids p 35S-CW-INV und Transformation von *Solanum tuberosum* cv. Desiree mit Hilfe dieses Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* sowie Analyse der transgenen Pflanzen bezüglich ihrer Invertaseaktivität.

a) Herstellung des Plasmids p35S-CW-INV

Die Herstellung des Plasmids p 35S-CW-INV ist in der EP 442 592 beschrieben und wird wie folgt durchge-

führt:

Eine DNA-Sequenz aus Hefe, die für das *suc2* Gen kodiert, wurde mit einem konstitutiven Expression bewirkenden Promotor der 35S-RNA des cauliflower-Mosaik-Virus sowie einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Poly-A Seite des Octopin-Synthase Gens.

Das Plasmid p 35S-CW-INV hat eine Größe von 7,1 kb und besteht aus den drei Fragmenten A, B und C, die in die angegebenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme des Polylinkers von pMPK110 kloniert wurden.

Das Fragment A beinhaltet den 35S Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al (1980) Cell 21, 285—294) umfaßt und wurde als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5857—5868) isoliert und zwischen die EcoRI-KpnI Schnittstellen des Plasmids pMPK110 kloniert.

Das Fragment B enthält die Nukleotide 923—1159 eines Proteinase Inhibitor II Gens aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (Keil et al (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5641—5650), welcher über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GGG ATC CCA GCT TTC an das *suc2* Gen aus Hefe, welches die Nukleotide +64 bis +1765 (Taussig und Carlson (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1943—1954) umfaßt, fusioniert ist. Dadurch wurde ein für die Aufnahme von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Invertase-Sequenz fusioniert. Das Fragment B wurde als SmaI/XmnI Fragment zwischen die SmaI/PstI Stellen des Polylinkers von pMPK110 gesetzt, wobei vor der Ligation die 3'-überhängenden Enden der PstI Schnittstelle durch Inkubation mit T4 DNA Polymerase stumpf gemacht worden sind.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gillen et al (1984) EMBO J. 3, 835—846, Nukleotide 11748—11939), welches als PvuII-HindIII Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al (1983) Nature 303, 209—213) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstellen des Polylinkers von pMPK110 kloniert worden war.

b) Transformation

Das die Fragmente A, B und C umfassende Teilstück des Plasmids p 35-CW-INV wurde in einen binären Vektor eingeführt und mit Hilfe des Agrobacteriumsystems in *Solanum tuberosum* cv. Desiree eingeführt. Aus transformierten Zellen wurden intakte und fertile Pflanzen regeneriert.

c) Analyse der Invertase Selektivität

Nach der Regenerierung wurde die Gesamtaktivität saurer Invertasen in den transformierten Pflanzen bestimmt.

Die Gesamtaktivität saurer Invertasen in transformierten Pflanzen war um zwei Größenordnungen höher als in Wildtyp-Pflanzen: 11,9+4,2 bzw. 14,5+9,1 $\mu\text{mol (mg chl. min)}^{-1}$ bei zwei unabhängigen Transformationen gegenüber (0,1 $\mu\text{mol (mg chl. min)}^{-1}$ beim Wildtyp. Bei Untersuchung der Kohlenhydratzusammensetzung des apoplastischen Raums zeigte sich eine 20fache Re-

duktion der Saccharosekonzentration sowie eine 20fache Steigerung des Glukose- und Fruktose-Gehalts im apoplastischen Raum. Dies belegt die apoplastische Lokalisation der eingeführten Invertase.

Ausführungsbeispiel 2

Untersuchung der Lagerkapazität von transgenen Kartoffelpflanzen mit gesteigerter apoplastischer Invertaseaktivität Kartoffelknollen von transgenen Kartoffeln, die gewonnen wurden wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, werden bei Raumtemperatur gelagert. Zum Vergleich ihrer Lagereigenschaften werden Knollen von Wildtyp-Pflanzen auf gleiche Weise gelagert. Es ist zu erkennen, daß die Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen zu einem späteren Zeitpunkt und in einem verringerten Ausmaß auskeimen. Die Konsistenz der transgenen Kartoffelknollen ist gegenüber derjenigen der Wildtyp-Knollen deutlich verbessert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung genetisch veränderter Kartoffelpflanzen, deren Auskeimung der Knollensprosse unterbunden ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Pflanze die Konzentration der für die Auskeimung der Sprosse notwendigen Saccharose reduziert wird durch Inhibition der am Stärkeabbau beteiligten Enzyme und/oder durch Abbau der bereits gebildeten Saccharose mittels eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls, das sich zusammensetzt aus:

i) einem in Pflanzenzellen funktionalen Promotor,

ii) mindestens einer kodierenden DNA-Sequenz in sense und/oder antisense Orientierung, die an eine Signalsequenz gekoppelt sein kann, und die derart an den Promotor i) fusioniert ist, daß der kodierende oder nicht-kodierende Strang abgelesen werden kann und

iii) einen in Pflanzen funktionalen Signal für Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines DNA-Moleküls und das auf einem Plasmid lokalisiert in das Genom der Kartoffelpflanze integriert wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante doppelsträngige DNA-Molekül die DNA-Sequenz, die für das Invertasegen kodiert, in sense Orientierung enthält.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante doppelsträngige DNA-Molekül die DNA-Sequenz, die für eine Amylase, Stärke-Phosphorylase, Maltase, Maltosephosphorylase, UDP-Glukose-Pyrophosphorylase, Saccharose-Phosphatsynthase oder Saccharose-Phosphat-Phosphatase kodiert, in anti-sense Orientierung enthält.

4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Invertase kodierende DNA-Sequenz in sense Orientierung mit einer für die Amylase, Stärke-Phosphorylase, Maltase, Maltosephosphorylase, UDP-Glukose-Pyrophosphorylase, Saccharose-Phosphatsynthase oder Saccharose-Phosphat-Phosphatase in anti-sense Orientierung zusammengeschlossen ist.

5. Verwendung des Invertasegen enthaltenden Plasmids p 35S-CW-INV (DSM 5788) zur Herstel-

lung von transgenen Kartoffelpflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß für verbesserte Lagerungseigenschaften der Kartoffelknolle in den Speicherorganen der Knollen die Mobilisation von Stärke unterdrückt wird, wobei gleichfalls das Auskeimen der Kartoffelknollen unterbunden wird. 5

6. Verwendung des Plasmids p 35S-CW-INV zur Herstellung von Kartoffelpflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß in den Knollen bei Lagertemperaturen über 8°C eine Anreicherung von reduzierenden Zuckern verhindert wird. 10

7. Kartoffelknollen, deren Lagerungseigenschaften durch das Unterbinden des Auskeimens der Sprosse verbessert sind.

8. Verwendung von Kartoffelknollen gemäß Anspruch 7 zur Herstellung von Kartoffelpflanzen, deren Knollen verbesserte Lagerungseigenschaften besitzen. 15

9. Verwendung des Plasmids p 35S-CW-INV gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die reduzierenden Zucker Fruktose und Glukose sind. 20

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

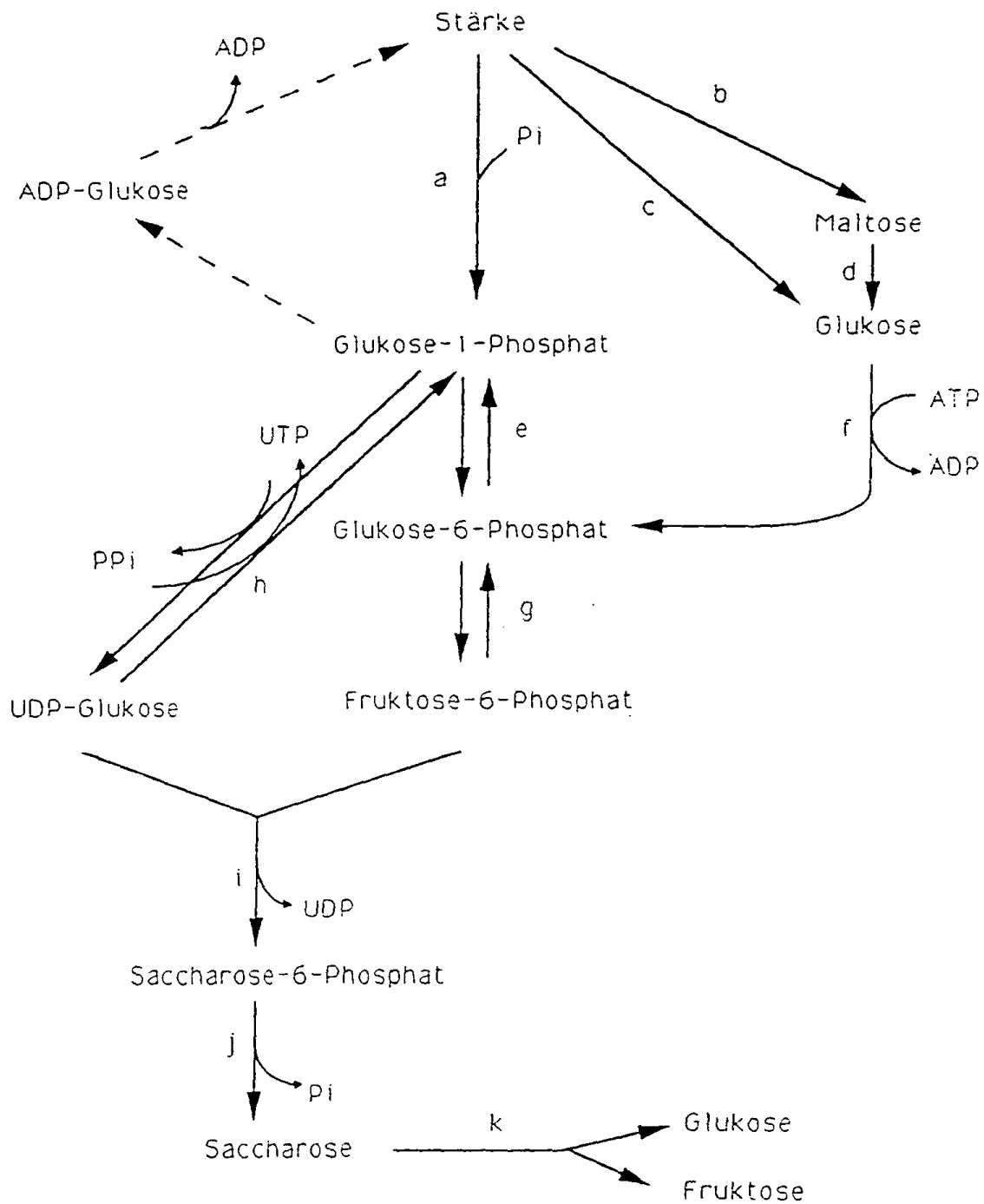


Fig. 1